



“Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible”

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Tesis

# Determinación de razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) Miraflor y Tisey 2020

### Autores

**Br. Jorge Alberto Fornos Blanco**  
**Br. Juan Carlos Rivera Moran**

### Asesores

**MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez**  
**Dr. Arnulfo José Monzón Centeno**  
**MSc. Danessa Joseph Ramírez Reynoza**

**Managua, Nicaragua**  
**Abril, 2021**



"Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible"

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Tesis

**Determinación de razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) Mirafior y Tisey 2020**

#### Autores

**Br. Jorge Alberto Fornos Blanco**

**Br. Juan Carlos Rivera Moran**

#### Asesores

**MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez**

**Dr. Arnulfo José Monzón Centeno**

**MSc. Danessa Joseph Ramírez Reynoza**

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador como requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal

**Managua, Nicaragua**

**Abril, 2021**

## Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

***Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal***

---

Miembros del Tribunal Examinador

---

Presidente (Grado académico y  
nombre)

Secretario (Grado académico y  
nombre)

---

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a mi Dios por brindarme salud, fuerza, sabiduría, amor e inteligencia para lograr culminar mis estudios profesionales.

A mi padre Jorge Alberto Fornos Espinoza por brindarme confianza, amor y apoyo.

A mi madre Isolda Auxiliadora Blanco Barboza por enseñarme valores y principios para formarme como una persona profesional ha sido el eslabón para la culminación de mi carrera universitaria.

A mis Hermanos Ing. Cristopher Alberto Fornos Blanco y Lic. Georgina Auxiliadora Fornos Blanco por sus ánimos y apoyo para continuar.

A toda mi familia y amistades que de una u otra manera han contribuidos para que terminara con mis estudios profesionales.

A mis abuelos Jorge Blanco Caballero y Auxiliadora Barboza por sus apoyos y ánimos para seguir adelante.

A mi maestro MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez por contribuir a mi formación profesional, por confiar en mí y permitirme realizar este trabajo.

Bendiciones.

Br. Jorge Alberto Fornos Blanco

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mi madre Santos Victoria Moran, por su apoyo incondicional desde el inicio de mi formación académica hasta el presente, por todo el esfuerzo y sacrificio para poder darme lo que he necesitado.

A mi tío Arturo Rivera por motivarme a continuar mi formación académica en esta universidad y apoyarme siempre que ha podido.

A todas las personas que de una u otra manera han sido parte de mi formación personal y académicamente.

Br. Juan Carlos Rivera Moran

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por regalarme esta oportunidad de culminar mis estudios, por el amor, salud y sabiduría en todo momento en el trayecto de mi vida.

A mis padres que siempre confiaron en mí que lo lograría y estar siempre dándome su apoyo.

A mis familiares especialmente a mis abuelos que siempre me han brindado su apoyo, dándome ánimos para llegar a cumplir unas de mis metas en mi vida.

Al Dr. Edgar Gutiérrez López por los ánimos, valores, apoyo y las enseñanzas que día a día me impartía para ser una persona profesional.

A mi compañero de Tesis Juan Carlos Rivera Moran por apoyo y dedicación para culminar este documento.

A la Lic. Allison Patricia Herrera por sus ánimos, apoyo y confianza. Me enseñó que si te propones algo en la vida lo puedes lograr.

A nuestros asesores MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez, Ing. Dannelsa Joseph Ramírez Reynosa y Dr. Arnulfo José Monzón Centeno por haber confiado en mí para llevar a cabo esta investigación, por regalarnos sus valiosos tiempo y conocimientos, por los aprendizajes que nos compartieron y orientarnos en la elaboración de nuestra tesis.

Al personal Técnico y docente del Laboratorio de Microbiología de la UNA Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo y MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora por habernos apoyado y regalado valiosos aprendizajes. A mis compañeros por ese apoyo mutuo y por sus palabras de admiración y fortaleza. A todas las personas que estuvieron conmigo, pendientes y ansiosas a que la finalización de este documento de tesis fuera todo un éxito.

Br. Jorge Alberto Fornos Blanco.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, doy gracias a Dios por la salud, fuerza y sabiduría que me ha brindado para romper cada obstáculo en mi vida, hasta alcanzar este logro.

Agradezco a mi madre Santos Victoria Moran, por brindarme su amor y apoyo incondicional, por educarme, por sus consejos, por motivarme a superarme cada día, por iniciarme en mis estudios y apoyarme desde entonces en ello.

A mi tío Arturo Rivera, por ser para mí una figura paterna, apoyarme siempre en los momentos más difíciles, por sus consejos, por el apoyo que me ha brindado para poder culminar mi carrera. También agradezco a su pareja Scarleth Andrónica Pineda, por brindarme su apoyo cuando lo he necesitado y por motivarme a seguir a delante en mis estudios.

A mis abuelos Teodora Moran y Vidal Rivera, por estar presentes en mi vida desde mi niñez hasta hoy, por ser parte de mi formación personal y académica, por el apoyo que han brindado a mi persona, a mi madre, hermano y hermana.

A mi compañero de tesis y amigo Jorge Alberto Fornos Blancos, por su dedicación a nuestro trabajo y siempre motivarme a seguir adelante en nuestra investigación.

A nuestros asesores de tesis Ing. Danessa Joseph Ramírez Reynosa, MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez, Dr. Arnulfo José Monzón Centeno, por confiar en nosotros para realizar este trabajo, por sus enseñanzas para nuestra formación profesional, su amistad y motivarnos en todo momento para continuar con nuestra investigación.

Al personal técnico y docente del Laboratorio de Microbiología Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo y MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora, por su apoyo en nuestro trabajo, por compartir sus conocimientos.

A todas las personas que directa e indirectamente han contribuido en mi formación personal y académica, entre ellas: Ramona Rivera, Martha Lorena Rivera, a todo el cuerpo docente de la Universidad Nacional Agraria que me impartieron las diferentes asignaturas.

Br. Juan Carlos Rivera Moran

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
<b>DEDICATORIA</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
<b>III. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>4</b>
3.1 Generalidades de la papa	4
3.1.1 Importancia económica y social	4
3.1.2 Requerimientos edáficos y climáticos para la producción de la papa	5
3.1.3 Zonas de producción de papa en Nicaragua	6
3.2 Descripción de <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
3.3 Importancia de <i>R. solanacearum</i>	6
3.4 Distribución geográfica de <i>R. solanacearum</i>	7
3.5 Síntomas de <i>R. solanacearum</i>	7
3.6 Mecanismos de resistencia bacteriana	8
3.7 Mecanismos del fenómeno de resistencia antimicrobiana	9
3.8 Antibióticos	10
3.9 Detección fenotípica de mecanismos de resistencia con antibiogramas	12
3.9.1 Antibiograma para bacterias	12
3.9.2 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	13
3.9.3 Betalactamasas tipo AmpC	13
3.9.4 Carbapenemasas	14
3.10 Prueba de hipersensibilidad	14



<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>15</b>
4.1 Ubicación del estudio	15
4.2 Colecta de muestras	15
4.3 Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> a partir de muestras de tejido y suelo	16
4.3.1 Test de flujo bacteriano	16
4.3.2 Método de dilución en serie	17
4.4 Identificación de biovars, razas y mecanismos de resistencia	17
4.4.1 Identificación de biovars	17
4.4.2 Caracterización de razas	18
4.4.3 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana	19
4.5 Variables evaluadas	20
4.6 Análisis de datos	20
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
5.1 Identificación de Biovars	21
5.2 Caracterización de razas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
5.3 Determinación fenotípica de mecanismo de resistencia	25
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>30</b>
<b>VIII. LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>31</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>37</b>

---

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Colecta de muestras en fincas productoras de papa en las reservas naturales Miraflor y Tisey del departamento de Estelí	15
2.	Diferenciación de biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
3.	Reacción en hojas de tabaco después de la infiltración con aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> aisladas del cultivo de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	19
4.	Biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> identificados en muestras procedentes del cultivo de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	22
5.	Caracterización de razas de <i>Ralstonia solanacearum</i> , según síntomas observados en plantas de tabaco en diferentes períodos después de la infiltración	24
6.	Mecanismos de resistencias identificados en aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> procedentes del cultivo de papa	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Representación esquemática del orden de los antibióticos utilizados para la identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
2.	Aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> en medio de cultivo TZC 1%. Colonias bacterianas aisladas de la reserva natural Miraflor (A y B) y colonias bacterianas aisladas de la reserva natural Tisey (C y D)	21
3.	Caracterización de aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> procedentes de muestras de suelo y tejido vegetal del cultivo de papa. Clorosis a partir de 48 horas posteriores a la infiltración (A y B), y marchitamiento a partir de los siete y ocho días posteriores a la infiltración (C y D)	23
4.	Aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> con fenotipos AmpC hiperproducido (A, B, C y D) y fenotipos salvajes (E y F) aislados de las zonas de muestreo	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Colecta de muestras con síntomas de marchitamiento bacteriano en fincas productoras de papa	37
2.	Test de flujo bacteriano positivo en muestras de tallos del cultivo de papa	37
3.	Inoculación de aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> en espacios intervenales de hojas de tabaco	38
4.	Criterios interpretativos de halos de inhibición	38
5.	Pruebas bioquímicas positivas para <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 3	39
6.	Resultados de lecturas de halos de inhibición producidos en los antibiogramas	39

## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo sembrado en más de cien países y el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo en términos de consumo humano, después del arroz y del trigo, es un alimento básico para países desarrollados como Europa y Estados Unidos. Este cultivo es afectado por diversos problemas fitosanitarios, entre los que sobresale *Ralstonia solanacearum*. El objetivo de este estudio fue identificar mediante prueba fenotípica los mecanismos de resistencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, aislada del cultivo de papa (*S. tuberosum* L.). La colecta de muestras se realizó en fincas de la reserva natural Miraflor y Tisey del departamento de Estelí. El aislamiento de la bacteria a partir de tejido vegetal se realizó con la prueba de flujo bacteriano, mientras que las muestras de suelo fueron sometidas al método de dilución en serie. La identificación de biovars se realizó con pruebas individuales de carbohidratos y la caracterización de razas fue mediante la prueba de infiltración de *Ralstonia solanacearum* en hojas de tabaco. Se identificaron 19 aislados con características de *Ralstonia solanacearum* que manifestaron reacciones positivas a las pruebas de Oxidasa, Catalasa y KOH 3%, además se caracterizaron por su crecimiento acuoso, colonias grandes, blancas y centro de color rosado en el medio cultivo TZC al 1%, con la prueba individual de azúcares se identificaron 14 aislados de *R. solanacearum*, como biovar 1, y los cinco restantes como biovar 3. Las reacciones en hojas de tabaco después de la infiltración de la bacteria mostraron que los 19 aislados de *R. solanacearum* pertenecen a la raza 1. Se identificaron 12 aislados de *R. solanacearum* con mecanismo de resistencia AmpC hiperproducido y siete aislados catalogados como salvajes.

**Palabras clave:** Infiltración, carbohidratos, antibiograma, AmpC, hipersensibilidad

## ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth crop grown in more than a hundred countries and the third most important food crop in the world in terms of human consumption, after rice and wheat, it is a staple food for developed countries such as Europe U.S. The objective of this study was to identify by phenotypic test the resistance mechanisms of the bacterium *Ralstonia solanacearum*, isolated from the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). The collection of samples was carried out on farms in the Miraflor and Tisey natural reserve in the department of Estelí. The isolation of the bacteria from plant tissue was carried out from the bacterial flux test, while the soil samples were subjected to the serial dilution method. The identification of biovars was carried out with individual tests of carbohydrates and the characterization of races was by means of the infiltration test of *Ralstonia solanacearum* in tobacco leaves. 19 isolates with characteristics of *Ralstonia solanacearum* were identified and showed positive reactions to the oxidase, catalase and 3% KOH tests, and were characterized by their aqueous growth, large, white colonies and a pink center in the 1% TZC culture medium. With the individual sugar test, 14 isolates of *Ralstonia solanacearum*, biovar 1 and five were identified as biovar 3. Reactions in tobacco leaves after infiltration of the bacteria showed that the 19 isolates of *Ralstonia solanacearum* belong to Race 1. Identified a total of 12 *Ralstonia solanacearum* isolates with hyperproduced AmpC resistance mechanism and 7 isolates cataloged as wild.

**Keywords:** Infiltration, carbohydrates, antibiogram, AmpC, hypersensitivity

## I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) forma parte de la familia de las solanáceas, es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, maíz y el trigo, debido a sus propiedades alimenticias y su rápido crecimiento. Sus tubérculos son parte de la dieta alimenticia de millones de personas en todo el mundo, su almidón es utilizado en la industria para la elaboración de papel, textiles, pegamento, bebidas alcohólicas y varios alimentos (Lim, 2016).

A pesar de la importancia que tiene el cultivo de papa, este se ve afectado por diversos factores que reducen el rendimiento y calidad de los tubérculos, y elevan los costos de producción. La papa es susceptible a más de 100 enfermedades causadas por diversos organismos como hongos, bacterias, micoplasmas y virus, y problemas de variaciones extremas de temperatura, deficiencias nutricionales, sequia, inundaciones, salinidad entre otros (Esquivel, 2017).

En Nicaragua, los factores que limitan la producción de papa son; la escasez de semilla, los altos costos de producción, pero sobre todo la baja calidad de los tubérculos. Durante el desarrollo del cultivo, las plagas producen diferentes tipos de daños y pueden ocasionar importantes pérdidas económicas (Molina, Mairena y Aguilar, 2004; INTA, 2020). Las enfermedades que más se presentan en el cultivo de papa son el tizón temprano (*Alternaria solani*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), punta morada (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) y marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (Ríos, 2007).

La marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* es una de las enfermedades bacterianas más importantes en el cultivo de papa. Su distribución está registrada desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Ríos, 2007). Fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en el año 1896 en cultivos de papa, tomate y berenjena; según Naranjo y Martínez (2013), la especie heterogénea *R. solanacearum* se debe tratar como un complejo de especies. Tradicionalmente las cepas de este complejo fueron clasificadas en cinco razas, de acuerdo con su gama de hospederos y en seis biovars, relacionados con sus propiedades bioquímicas.

Las bacterias han desarrollado mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero es por poseer de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano. El segundo se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivantes de los

antibióticos constituye el tercer mecanismo; de esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el caso más típico es el de las betalactamasas, para el grupo de los betalactámicos (Duarte-Raya y Granados-Ramírez, 2012).

En Nicaragua los estudios de mecanismos de resistencia en *Enterobacteriáceas* están orientados hacia la parte clínica, por tanto, no existen estudios de mecanismos de resistencia en bacterias fitopatógenas. El objetivo de esta investigación es aportar información sobre las razas, biovars y el fenómeno de mecanismos de resistencia de *R. solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), que sirva de base para diseñar estrategias de manejo de la marchitez bacteriana y disminuir la resistencia de la bacteria a los antibióticos.



## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Generar información sobre las razas, biovares y el fenómeno de mecanismos de resistencia de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), que sirva de base para diseñar estrategias de manejo de la marchitez bacteriana y limiten el desarrollo de resistencia de la bacteria.

### 2.2 Objetivos Específicos

Identificar *Ralstonia solanacearum* y caracterizar biovares a partir de muestras de tejido vegetal y suelo del cultivo de papa.

Caracterizar las razas de *Ralstonia solanacearum* mediante prueba de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

Determinar los mecanismos de resistencia natural y adquirida de *Ralstonia solanacearum* mediante la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer).

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Generalidades de la papa

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), es una especie que pertenece a la familia de las solanáceas, planta suculenta, herbácea, anual en su parte aérea y perenne por sus tubérculos subterráneos formados al final de los estolones que nacen de los tallos principales. Presentan hojas compuestas e imparipinadas, de forma lanceolada. Presenta tres tipos de tallos, uno aéreo circular, del que disponen las hojas, y dos tipos de tallos subterráneos; los rizomas y los tubérculos. La raíz es de tipo fibroso, ramificado y extendido superficialmente y puede llegar a alcanzar una profundidad aproximada de 80 centímetros, (Leveratto, 2015; Ríos, 2007).

Es un cultivo originario de Sudamérica, entre Perú y Bolivia, cerca del lago Titicaca, y se ha distribuido a gran parte del mundo, conquistando incluso los lugares más remotos, donde ha sido introducida para su explotación, (Leveratto, 2015; Ríos, 2017). “Esta especie se cultiva y se encuentra primordialmente en zonas con climas templados, aunque también son tolerantes hacia climas más calientes pero fresco, el intervalo altitudinal de esta especie va desde los 1,300 a 3300 msnm, aunque pueden adaptarse a menor y mayor altitud dependiendo de la variedad cultivada” (Lim, 2016, p. 5).

##### 3.1.1 Importancia económica y social

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), es parte de la dieta alimenticia en diversas partes del mundo, debido a su aporte nutricional. Respecto al aporte nutricional Torrez (2009), refiere:

Es un alimento muy nutritivo que desempeña funciones energéticas debido a su alto contenido en almidón, así como funciones reguladoras del organismo por su elevado contenido en vitaminas hidrosolubles, minerales y fibra. Además, tiene un contenido no despreciable de proteínas, presentando un valor biológico relativamente alto dentro de los alimentos de origen vegetal (p. 37).

Por sus diversas utilidades industriales, “es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial y el alimento básico de los países desarrollados como Europa y USA, sin embargo, en los países en desarrollo se presentan limitantes para la obtención del producto” (Román y Hurtado, 2002, p.8).

En Nicaragua la producción de la papa para el consumo fresco es deficiente, debido a la escasez de semilla de calidad, altos costos de producción, manejo agronómico y acceso a fuentes de financiamiento. Por otra parte esta la sanidad del cultivo debido ha que la papa es susceptible a diversas plagas, causantes de enfermedades que pueden ocasionar grandes pérdidas, tanto económicas, como de la calidad de los recursos como el agua y el suelo (Torrez, 2009, p. 37).

En cuanto a las infecciones producidas por hongos, oomicetes, virus y bacterias, Borba (2008), resalta que:

Entre las afecciones por hongos se encuentra la enfermedad conocida como tizón temprano, ocasionado por *Alternaria solani* y el tizón tardío que es causado por el Oomicete *Phytophthora infestans*. La bacteria que causa mayor daño a los cultivos de papa se llama *Ralstonia solanacearum*, además de provocar la pérdida del tubérculo y la planta, se fija en el suelo, por lo que esa tierra debe ser abandonada para este cultivo. Las virosis presentan una dificultad importante porque comprometen el rendimiento del cultivo, esto se intenta combatir con la compra de semillas libres de virus, pero no significa una solución, ya que si el cultivo se vuelve a contaminar, se pierde esa producción y genera una dependencia a la importación de semilla (p. 5).

En Nicaragua se cultiva entre 800 y 1,200 ha de papa y se obtiene una producción que abastece de 35 a 40% de la demanda nacional. La FAO reporta un consumo de papa equivalente a 8 kg per cápita anuales, en Nicaragua (Ríos, 2007). Torrez (2009) mencionan que “desde el punto de vista comercial existe desconocimiento del potencial y aprovechamiento del mercado de las solanáceas, del valor nutritivo, del valor económico y de la importancia en la alimentación humana” (p. 37)

### **3.1.2 Requerimientos edáficos y climáticos para la producción de la papa**

Según Roman y Hurtado (2002) el cultivo de papa es más apto cultivarse en zonas altas, la altitud ideal para el desarrollo y producción del cultivo de la papa para consumo se encuentra entre los 1,500 a 2500 msnm, pero puede cultivarse en alturas menores. En cuanto al tipo de suelo, se adapta mejor a suelos francos, franco-arenosos, franco-limosos y franco-arcillosos, de textura liviana, con buen drenaje y con una profundidad efectiva mayor de los 0.50 m, que permitan el libre crecimiento de los estolones y tubérculos y

faciliten la cosecha. Las temperatura que perminten el desarrollo de tuberculos esta entre 18°C a 25°C, y necesita una variacion de temperatura entre el dia y la noche como mínimo de 10 °C de lo contrario se ve afectado el ciclo vegetativo, la calidad y el rendimiento en cosecha. (p. 14)

La luminosidad que reciben las plantas varía de 12 a 16 horas al día (según la especie cultivada), es importante para la fotosíntesis y fotoperiodos requeridos por la planta. Los recursos del agua en el suelo, es lo que influye en el crecimiento, fotosíntesis y absorción de nutrientes, un rango óptimo de humedad del suelo es de 60-80% principalmente en etapa de formación de tubérculos. (Molina *et al.*, 2004)

### **3.1.3 Zonas de producción de papa en Nicaragua**

Según Menocal, (2006), “en Nicaragua se siembra en zonas con alturas entre 900 a 1,500 msnm, ubicadas en los departamentos de Matagalpa, Jinotega, Madrid y Estelí”(p.15).

### **3.2 Descripción de *Ralstonia solanacearum***

En las solanáceas la enfermedad causada por *R. solanacearum* es conocida como marchitez bacteriana y está declarada oficialmente como plaga no cuarentenaria en Nicaragua. por el Instituto de protección y sanidad agropecuaria (IPSA, 2019). Es una devastadora enfermedad que afecta varios cultivos hortícolas y en solanáceas es de importancia a nivel mundial y nacional. La capacidad de supervivencia del patógeno y la ocurrencia de infecciones latentes hace que el diagnóstico tenga una importante función en la prevención de la enfermedad. (Naranjo y Martínez , 2013).

La bacteria *R. solanacearum*, es un bacilo Gram negativo, con dimensiones de 0.5-0.7 µm x 1.5-2.5 µm, móvil, con uno o cuatro flagelos polares cuando están presentes, sin embargo, la motilidad y posible presencia de flagelos de las cepas varía con el tipo de colonia y edad del cultivo (Bolaños, 2013).

### **3.3 Importancia de *R. solanacearum***

El cultivo de papa es afectado por diversos organismos que se comportan como plaga, y pueden causar importantes pérdidas, además son causantes de enfermedades muy agresivas. “La marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* es una de las enfermedades de mayor

importancia mundial junto al tizón tardío causada por *Phytophthora infestans*” (Fernández, 1985).

Actualmente *R. solanacearum* está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales, esto representa una limitante para la producción, no solo de papa, sino también de maní, tabaco, banano, tomate y otros cultivos. Se estima que esta enfermedad ha provocado daños en al menos 3 millones de fincas familiares en 80 países alrededor del mundo y se estima que las pérdidas económicas exceden los US \$950 millones anuales (Esquivel, 2017).

### **3.4 Distribución geográfica de *R. solanacearum***

La marchitez bacteriana se ha diseminado en la mayoría de los países productores de papa. Esta enfermedad se encuentra afectando en todo el centro y sur de África. La infección latente de los tubérculos ha provocado la disminución de las exportaciones de papa hacia Europa, y en el sur de Asia, la marchitez bacteriana afecta a los cultivos ubicados a altitudes moderadas en Himalaya, Pakistán, Nepal y Bután. (Ríos, 2007).

En América Latina, se ha reportado la existencia de la marchitez bacteriana en todos los países productores de papa con excepción de Ecuador. Su presencia en Australia y en el sudeste de los Estados Unidos ha estimulado las investigaciones sobre la enfermedad en estos países. Se reportan presencia de *R. solanacearum* en Suecia y a grandes altitudes en Costa Rica, Colombia y Perú, de tal manera que existen posibilidades potencialmente para la supervivencia de la bacteria e infección de cultivos de papa a temperaturas relativamente bajas. (Ríos, 2007).

### **3.5 Síntomas de *R. solanacearum***

Los síntomas inducidos por *R. solanacearum* aparecen según Champoiseau, Jones y Allen (2009), en las primeras etapas de la enfermedad, los primeros síntomas visibles aparecen generalmente en el follaje de las plantas. Estos síntomas consisten en marchitamiento de las hojas más jóvenes en las partes terminales de las ramas durante la parte más caliente del día. En esta etapa, sólo una o la mitad de una hojuela se puede marchitar, y las plantas parecerán recuperarse por la noche, cuando la temperatura está más fresca. A medida que la enfermedad se desarrolle bajo condiciones favorables, la planta entera se puede marchitar rápidamente y

desecarse, aunque las hojas secas se mantengan verdes, conduciendo a marchitamiento general, amarillamiento del follaje, y finalmente a la muerte de la planta (p.1-2).

En cuanto a los síntomas internos Naranjo y Martínez (2013) manifiestan:

Se basan en el cambio de color de los haces vasculares a color pardo o amarillo, en etapas tempranas de la enfermedad. En estadios avanzados, la degradación de las vesículas obstruidas del xilema, combinada con la extensiva invasión y la destrucción de los tejidos circundantes (floema, córtex y epidermis) producen el colapso y muerte de la planta (p.162).

Otro síntoma muy común que está asociado con la marchitez bacteriana en campo es el enanismo, este síntoma normalmente aparece en cualquier etapa del crecimiento de la planta.

### **3.6 Mecanismos de resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana es un problema continuo y en aumento. Se hace aun mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no solo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie (Moreno González y Beltrán, 2009). Uno de los mecanismos más utilizados por las bacterias es disminuir la presencia de los antibióticos en su interior modificando su permeabilidad, esto altera su mecanismo de transporte activo en la membrana celular y genera el mecanismo de eliminación activa del antibiótico (Echevarría, 1998).

Las bacterias, por su capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de sitios diana para el antibiótico (como la falta de pared en el caso de *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico debido a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. Pero la resistencia transmisible es la más importante porque es mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

### **3.7 Mecanismos del fenómeno de resistencia antimicrobiana**

Las Enzimas Hidrolíticas: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre los microorganismos. Las Beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclicas del anillo beta-lactámico, es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Existen continuas mutaciones que producen expresión de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e impide la destrucción de antimicrobiano y de esta manera permite su acción (Moreno *et al.*, 2009).

La modificación del sitio activo: Es un aminoácido que genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. La Modificación de PBP (proteínas de unión a la penicilina), es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas. La Modificación ribosomal es debido a que los genes *erm A* y *erm B* modifican el sitio activo del ribosoma, mediante metilación (Moreno *et al.*, 2009).

EL PBP (proteínas de unión a la penicilinas): Es el complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en las Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, estos no pueden actuar y se generan resistencia a ellos (Moreno *et al.*, 2009).

Modificación ribosomal: Son los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Moreno *et al.*, 2009).

Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: Son los Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. Existe disminución de la expresión de porinas (downregulation) lo que disminuye la susceptibilidad a betalactámicos y fluorquinolonas en *Pseudomonas* (Moreno *et al.*, 2009).

Las Bombas de eflujo: Transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Los genes involucrados son MefA (*Streptococcus pneumoniae*), NorA (*Staphylococcus aureus*) y Mex (*Pseudomonas aeruginosa*). Estos genes explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a fluoroquinolonas. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidor de bombas de flujo junto con el antimicrobiano (Moreno *et al.*, 2009).

### **3.8 Antibióticos**

Ampicilina más ácido clavulánico (AMP): Es un antibiótico semisintético, aunque es más activo que las penicilinas naturales no son estable frente a las beta-lactamasa producidas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, con acción bactericida que actúa a nivel de la pared celular de las bacterias. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBP (proteínas de unión a la penicilina) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona en último término la lisis de la bacteria y su muerte. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Medica, 2004).

Cefoxitina (FOX): Es un antibiótico de amplio espectro de la familia de las cefamicinas, deriva de la cefamicinas C, una sustancia producida por *Streptomyces lactamdurans*. Es un agente bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. La Cefoxitina tiene actividad en presencia de algunas beta-lactamasas, tanto penicilinasas como cefalosporinasas producidas por bacterias Gram negativas y Gram positivas. La resistencia a la Cefoxitina es mediada principalmente a través de la hidrólisis por beta-lactamasas, la alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBP), y la disminución de la permeabilidad de la pared celular. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Medica, 2014).

Ceftazidima (CAZ): Es una cefalosporina de tercera generación muy activa tiene un espectro amplio contra las bacterias Gram negativas aerobias en comparación con las Cefalosporinas de primera o segunda generación, es menos activa contra organismos Gram positivos que las cefalosporinas de primera generación. La Ceftazidima es un antibiótico beta-lactámico como las penicilinas, inhibe la tercera y la última etapa de las síntesis de la pared celular bacteriana por



su afinidad por las PBPs específicas que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Medica, 2014).

Amoxicilina (AMC): Es una Penicilina semi-sintética similar a la ampicilina, tiene un espectro de actividad antibacteriana superior al de la penicilina, sin embargo, no es estable frente a las beta-lactamasas. Los antibióticos beta-lactámicos como la amoxicilina son bactericidas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular, al impedir que la pared celular se construya correctamente, produce la lisis de la bacteria y su muerte. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Medica, 2015).

Cefepima (FEP): Es una cefalosporina de tercera generación con la farmacocinética y el espectro de actividad similar a la Ceftazidima. Tiene un comportamiento comparable a la Ceftazidima frente a las *Pseudomonas aeruginosa* puede ser más activo que la Ceftazidima frente a los *Enterobacter* sp, debido a la estabilidad mejorada frente a beta-lactamasas. La cefepima inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las proteínas de unión específicas para la penicilina (PBP) que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. La actividad intrínseca de la cefepima, así como la de otras cefalosporinas y penicilinas, contra un organismo particular depende de su capacidad para obtener acceso a las PBPs, es la que conduce en última instancia a la lisis celular. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Medica, 2012).

Imepenem (IMP): Es derivado de la tienamicina, considerado como un antibiótico beta-lactámico y es el primer miembro de la familia de los antibióticos carbapenem, se metaboliza rápidamente y causa efectos tóxicos en el túbulo proximal. Posee características que lo convierten en un antibiótico muy efectivo, tales como, penetración más eficiente a través de la pared celular bacteriana, resistencia a las enzimas bacterianas y afinidad por todas las proteínas de unión a las penicilinas (PBPs) bacterianas. Inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión a determinadas proteínas de unión de las penicilinas (PBPs) que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. Las proteínas de unión a las penicilinas son responsables de varios pasos en la síntesis de la pared celular (Centro

colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2012).

Meropenem (MEM): Es un antibiótico Semi-sintético de la familia de los carbapenems, inhibe la formación de pared celular, facilitando la lisis de bacteria siendo su efecto bactericida. La interferencia del meropenem con la síntesis de la pared celular tiene lugar en la fase tercera y última de la misma, al unirse de forma preferencial a proteínas bacterianas, denominadas proteínas de unión específicas de las penicilinas (PBPs). El meropenem es una sustancia anfótera que atraviesa fácilmente la membrana externa de la célula. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2014).

Ácido Etilendiamino Tetra Acético (EDTA): Es considerado el agente quelante más usado en química analítica. Se denominan quelantes a las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular. Estas sustancias captan los iones metálicos del complejo molecular al cual se encuentran entrelazados, fijándolos por unión coordinada que se denomina quelación. El EDTA y los iones de calcio forman un complejo estable y la reacción entre ambos continúa hasta alcanzar un equilibrio. El EDTA como agente quelante atrapa los iones metálicos de calcio en forma de quelatos (García, 2001).

### **3.9 Detección fenotípica de mecanismos de resistencia con antibiogramas**

Existen métodos para detección de mecanismos de resistencias bacterianas, tales como, microdiluciones en caldos, prueba de difusión de discos de Kirby Bauer, prueba de aproximación de doble disco, prueba de asociación con ácido clavulánico y el método E-test (Vespero, Perugini y Saridakis, 2007)

#### **3.9.1 Antibiograma para bacterias**

Las pruebas de los antibiogramas determinan la susceptibilidad de un organismo a tratamientos antimicrobianos, esta prueba se puede realizar en bacterias y hongos. En algunos microorganismos los resultados obtenidos permiten predecir los resultados que se puedan obtener con otros fármacos similares. Las pruebas también sirven para determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos (Hazen, 2018).

El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa Petri previamente inoculada en los microorganismos, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Cuando el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. La concentración de antibiótico de la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocida que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad al antimicrobiano (García, Cantón, García, Gómez, Martínez, Rodríguez y Villa, 2012).

### **3.9.2 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Las betalactamasas son enzimas de espectro extendido (BLEE) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximinocefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no cefeminas (cefoxotina) ni carbapenémicos (imipemen, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Otras técnicas basadas en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas por ácido clavulánico y su variante en las técnicas de microdilución que permite conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor. La técnica de difusión en gradiente (Etest) con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin inhibidores es también una prueba útil para la detección de BLEE (Calvo, Cantón, Fernández, Mirelis y Navarro 2011).

### **3.9.3 Betalactamasas tipo AmpC**

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo uno de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros) hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas y en menor medida las de tercera generación, son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenémicos. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencias a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de sus respectivos fenotipos salvaje o de resistencia natural siendo

los marcadores de mayor utilidad la sensibilidad intermedia o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y algunas de las cefalosporinas de tercera generación (Calvo *et al.*, 2011).

#### **3.9.4 Carbapenemasas**

Las bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos en los últimos años ha producido alarma y preocupación por la dispersión de bacilos con producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles. Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas Carbapenemasas (KPC) hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad de los microorganismos en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas (Calvo *et al.*, 2011).

#### **3.10 Prueba de hipersensibilidad**

La prueba o test de hipersensibilidad en no huésped consiste en la inoculación del mesófilo de una hoja de una planta con el objetivo de conocer si la bacteria inoculada es o no una bacteria fitopatógena. Cuando la planta reconoce como patógeno a la bacteria infiltrada en su mesófilo se produce una reacción de hipersensibilidad y la zona infiltrada se necrosa rápidamente (en 24 a 48 horas). Esta prueba permite agilizar el proceso de diagnóstico de las enfermedades bacterianas, se logra descartar de forma rápida aquellas bacterias contaminantes o saprofitas y saber cuál de los aislados es la bacteria fitopatógena (Harrigan y Cance, 1996, p. 2).

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Ubicación del estudio

El estudio de identificación de raza, biovars y detección de mecanismos de resistencia a antibióticos que presenta la bacteria *R. solanacearum* se realizó en el laboratorio de microbiología e invernadero de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicado en el km 12½ carretera norte municipio de Managua.

El tipo de investigación fue no experimental, descriptivo de corte transversal. El estudio fue realizado en el período de septiembre 2020 a febrero 2021. La investigación se realizó en dos etapas, en la primera se colectó muestras de tejido vegetal y suelo, para aislar e identificar *R. solanacearum*; en la segunda etapa se realizaron las pruebas de laboratorio para la identificación de biovars, caracterización de razas y de mecanismos de resistencia de *R. solanacearum*.

### 4.2 Colecta de muestras

Para la obtención de las muestras se seleccionaron fincas productoras de papa localizadas en las reservas naturales Miraflor y Tisey del departamento de Estelí. Los criterios para la selección de las fincas fueron: productoras de papa, fácil acceso al cultivo, plantaciones con edades entre 30-45 días y la observación de síntomas de marchitez bacteriana.

Cuadro 1. Colecta de muestras en fincas productoras de papa en las reservas naturales Miraflor y Tisey, Estelí

Finca	Localidad	Variedad	Nombre de la finca	Edad de la planta	Área de siembra	No de muestras
1	Miraflor	Hactri	Zacatón	1 mes	2 mz	11
2	Miraflor	Evora	El Cebollal	40 días	½ mz	11
1	Tisey	Hactri y Granola	Modesto Moncada	1 mes	1 mz	10
2	Tisey	Picasso	La Tejera	1 mes	1½ mz	9
3	Tisey	Picasso	La Tejera	40 días	½ mz	7

Las muestras de tejido vegetal y suelo fueron colectadas en el departamento de Estelí en fincas productoras de papa de las reservas naturales Miraflor y Tisey. Se colectaron un total de 48

muestras, tanto de tejido vegetal como de suelo; se tomaron como muestras de tejido las plantas de papa. (*Solanum tuberosum* L.), que presentaban los síntomas, característicos de *R. solanacearum* y las muestras de suelo de la rizosfera de dichas plantas (Anexo 1). Las muestras se introdujeron en bolsas plásticas, se rotularon y se almacenaron en un termo para evitar daños y conservarlas en condiciones más adecuadas y de esa manera fueron trasladadas al laboratorio de microbiología. En la reserva natural Miraflores se colectaron un total de 22 muestras en dos fincas y en la reserva natural Tisey se colectaron un total de 26 muestras en tres fincas.

Las muestras de tejido vegetal y de suelo se sometieron a métodos de aislamiento bacteriano: las muestras de tejido a la prueba de flujo bacteriano y las muestras de suelo al método de dilución en serie.

#### **4.3 Aislamiento de *R. solanacearum* a partir de muestras de tejido y suelo**

Para el aislamiento de *R. solanacearum*, las muestras que resultaron positivas en la prueba de flujo bacteriano se rayaron en el medio de cultivo cloruro de tetrazolium al 1%, y en este mismo medio fueron sembradas muestra sometidas a dilución en serie.

##### **4.3.1 Test de flujo bacteriano**

Las muestras de tejido colectadas con síntomas de la enfermedad fueron sometido a la prueba de flujo bacteriano la cual consiste realizar cortes del tallo de la planta, posteriormente se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% y luego se lavaron con agua destilada estéril (ADE). A continuación, se sumergieron los trozos de tallo en ADE contenida en un tubo de ensayo y se procedió a observar la presencia o no de un hilo blanco (Anexo 2) que se denomina flujo bacteriano (Perea *et al.*, 2011).

El flujo bacteriano fue rayado en el medio agar cloruro de tetrazolium (TZC) con un asa bacteriológica, las placas petri fueron incubadas a 30°C un periodo de 48 horas. Posterior a la incubación se observaron las características macroscópicas del crecimiento de la bacteria (tamaño, forma, superficie, bordes, color y producción de pigmento de cada una de las cepas o colonias bacterianas detectadas). Según Kelman (1954); Champoiseau *et al.*, (2009) las características principales de las colonias de *Ralstonia solanacearum* en el medio TZC son

irregularmente redonda, acuosa, blanca y con el centro de color rosado, las colonias avirulentas son de color rojo oscuro.

#### **4.3.2 Método de dilución en serie**

Se homogenizó y se pesaron 10 g de las muestras de suelo y se adicionaron en un Erlenmeyer (de 150 ml) que contenía 90 ml de agua destilada estéril, para obtener una concentración inicial de  $1/10$  ó  $10^{-1}$ , posteriormente se homogenizó la solución y se dejó reposar por unos segundos para que se diera la sedimentación de las partículas más grandes, luego se transfirió un ml de esta solución a un tubo de ensayo que contenía nueve ml de agua destilada estéril, para lograr obtener una concentración de  $10/100$  ó  $10^{-2}$ , consecutivamente se realizó este mismo procedimiento hasta llegar a las concentraciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , que fueron las utilizadas para inocular el medio de cultivo agar cloruro de tetrazolium (TZC 1%), depositando la cantidad de 100 ml en cada plato Petri.

#### **4.4 Identificación de biovares, razas y mecanismos de resistencia**

La identificación de biovares consistió en realizar prueba individual de carbohidratos y observar reacciones de oxidación -fermentación, mientras que las razas fueron caracterizadas en plantas individuales de tabaco, anotando el periodo de reacción en las hojas y el mecanismo de resistencia de la bacteria fue determinado mediante la prueba de Kirby -Bauer.

##### **4.4.1 Identificación de biovares**

Los biovares de *Ralstonia solanacearum* fueron diferenciados mediante la prueba individual de carbohidratos (Cuadro1), basada en la formación de ácido a partir de tres disacáridos (Lactosa, Maltosa y Celobiosa), y la oxidación de tres hexosas alcohólicas (Dulcitol, Manitol y Sorbitol). Los tubos fueron examinados a los 3, 7,14 y 28 días después de la inoculación. El cambio de coloración en el medio de purpura a amarillo indicaron resultados positivos (Schaad, Jones y Chun 2001; French, Gutarra y Aley 1995).

Cuadro 2. Diferenciación de biovares de *Ralstonia solanacearum*

Prueba de Carbohidratos	Biovares				
	1	2	3	4	5
Lactosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	-	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-
Trealosa	+	-	+	+	+
Manitol	-	-	+	+	-

Reacción positiva: (+); Reacción negativa: (-)

Fuente: French *et al.* (1995)

#### 4.4.2 Caracterización de razas

Se preparó una suspensión bacteriana a partir de cultivos puros con 24-48 horas de incubación, en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC, (0.5 escala Mackfarland), posteriormente se hicieron orificios sobre el haz de la hoja en zonas intervenales con una aguja hipodérmica N° 29, luego se inoculó con una jeringa sin aguja, la suspensión bacteriana, apoyando la jeringa sobre la superficie de la hoja y presionando por debajo con los dedos. Los resultados se monitorearon un periodo de 12 a 96 horas.

Los criterios que se utilizaron para la caracterización de las razas fueron los descritos por Lozano y Sequeira (1970), que consiste en la observación de síntomas tales como, clorosis, marchitamiento y reacción de hipersensibilidad (Cuadro 2, Anexo 3).



Cuadro 3. Reacción en hojas de tabaco después de la infiltración con aislados de *Ralstonia solanacearum* aisladas del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

<b>Raza</b>	<b>Criterios de caracterización</b>
1	Causa clorosis a los dos días después de la inoculación y marchitamiento típico después de 7-8 días
2	Provoca reacción hipersensitiva 12-24 horas después de la inoculación
3	Causa solamente clorosis 2-8 días después de la inoculación.

Fuente: Lozano y Sequeira (1970)

#### 4.4.3 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana

La identificación de mecanismo de resistencia se realizó mediante prueba de difusión de discos de Kirby Bauer que consiste en la medición y observación visual del tamaño y forma de los halos de inhibición producida por la sinergia entre los discos de antibióticos (Anexo 4).

Los antibióticos utilizados en este estudio fueron Cefoxitina (FOX), Cefepima (FEP), Ceftazidima (CAZ) Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC), Ampicilina (AMP), Meropenem (MER), Imepenem (IMP) e inductor EDTA (Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (2004). La posición u ordenamiento de los discos es con el propósito de establecer sinergia entre ellos y evaluar la expresión fenotípica frente a los betalactámicos (Figura 1).

La observación de aislados de *Ralstonia solanacearum* resistentes a Cefoxitina (ausencia de halo o halo menor a 14 mm indica la presencia de AmpC, en el caso de resistencia CAZ y FEP con observación de achatamiento en la zona de sinergia con AMC indican la presencia de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). La utilización en este estudio de Meropenem e Imepinem fue para descartar la posibilidad de aislados con presencia de Carbapenemasas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014).

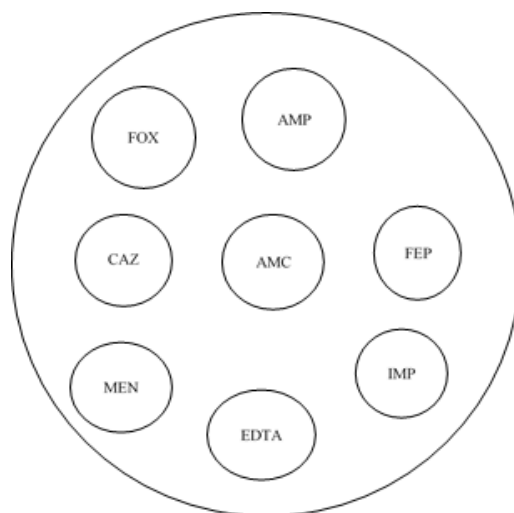


Figura 1. Representación esquemática del orden de los antibióticos utilizados para la identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de *Ralstonia solanacearum*.

#### 4.5 Variables evaluadas

Por tratarse de un estudio descriptivo, las variables hacen referencia a las pruebas realizadas:

Biovars identificados: Los biovars de *Ralstonia solanacearum* fueron diferenciados mediante la prueba individual de carbohidratos, basada en la formación de ácido a partir de tres disacáridos y la oxidación de tres hexosas alcohólicas (Schaad *et al.*, 2001).

Reacción de hipersensibilidad: Posterior a la infiltración de la bacteria en el haz de las hojas en platas de tabaco presentaron los síntomas, tales como necrosis, marchitez y halos cloróticos, en un periodo de tiempo de 12-120 horas según los descrito por Lozano y Sequeira (1970).

Mecanismos de resistencia natural y adquirida: La identificación de mecanismo de resistencia se realizó mediante la medición con una regla milimétrica de los halos de inhibición y la forma producida por la sinergia de los discos de antibióticos (Clinical and Laboratory Standards Institute, (2014).

#### 4.6 Análisis de datos

Los datos fueron organizados en una hoja de cálculo Excel 2013, para calcular la frecuencia de aislados con mecanismos de resistencia, por la naturaleza de los datos no se realizó ningún análisis estadístico paramétrico.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Identificación de Biovares

A partir de las muestras de tejido vegetal y de suelo se obtuvo un total de 19 aislados de *R. solanacearum*, de estos 11 aislados se obtuvieron de muestras provenientes de la reserva natural Mirafior y 8 aislados de muestras de la reserva natural Tisey. Los 19 aislados identificados como *R. solanacearum*, manifestaron reacciones positivas a las pruebas de oxidasa, catalasa y KOH 3%, además se caracterizaron por su crecimiento acuoso, colonias grandes, blancas y centro de color rosado en el medio cultivo TZC al 1 % de Kelman (Figura 2).

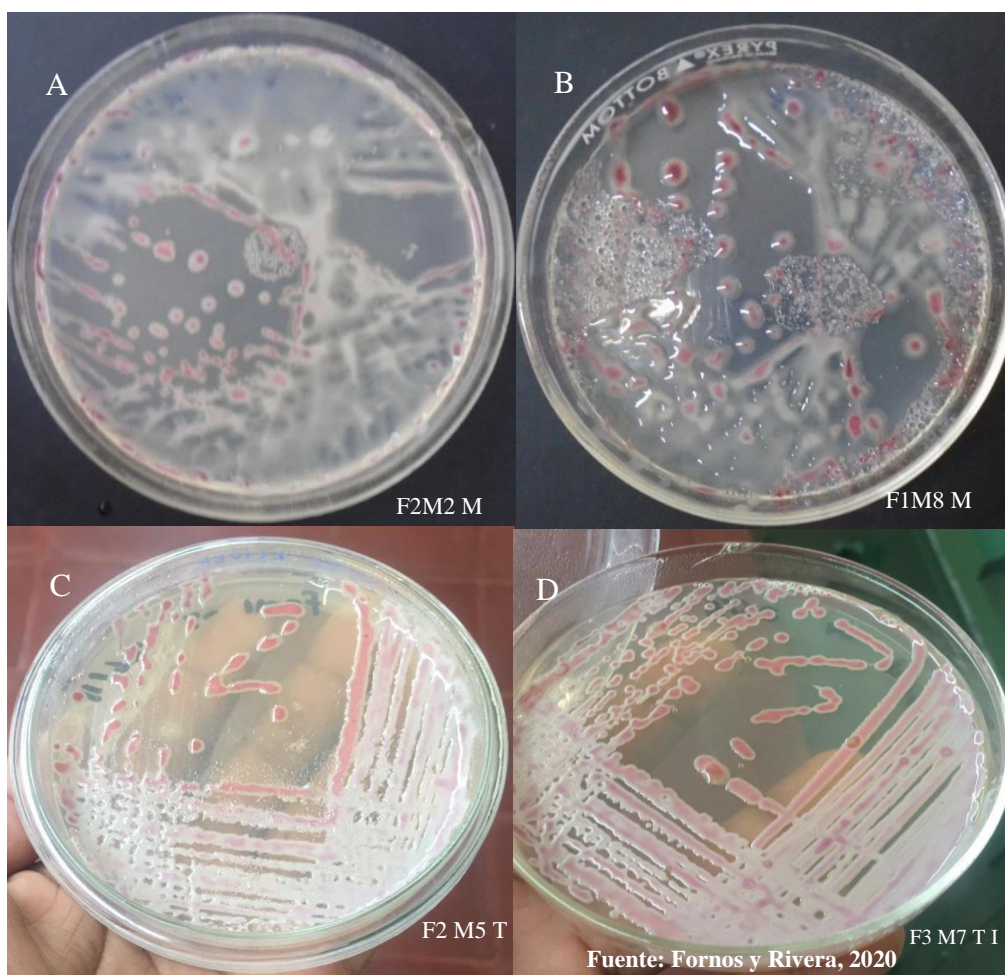


Figura 2. Aislados de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo TZC 1%. Colonias bacterianas aisladas de la reserva natural Mirafior (Ay B) y colonias bacterianas aisladas de la reserva natural Tisey (C y D).

Los resultados de las pruebas bioquímicas de fermentación- oxidación de carbohidratos, permitieron identificar 14 aislados de *R. solanacearum* pertenecientes al biovar 1 y 5 aislados identificados como biovar 3, en muestras de suelo y tejido vegetal del cultivo de papa, procedentes de las reservas naturales Miraflores y Tisey. Los aislados identificados como biovar 1 mostraron resultados negativos en cada uno de los carbohidratos utilizados en este estudio, mientras que el biovar 3 mostró resultados positivos en cada prueba. En este estudio el biovar 1 fue el más frecuente en relación con el biovar 3 (Cuadro 3, Anexo 5).

Cuadro 4. Biovares de *R. solanacearum* identificados en muestras procedentes del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Código de aislados	Disacáridos			Hexosas alcohólicas			Biovar
	Maltosa	Lactosa	Celobiosa	Dulcitol	Sorbitol	Manitol	
F3 M7 T I	-	-	-	-	-	-	1
F2 M4 M	+	+	+	+	+	+	3
F2 M6 T	-	-	-	-	-	-	1
F1 M7 T II	-	-	-	-	-	-	1
F2 M10 M	-	-	-	-	-	-	1
F2 M7 M III	-	-	-	-	-	-	1
M10 M	+	-	+	+	+	+	3
F2 M7 M II	-	-	-	-	-	-	1
F2 M9 M	-	-	-	-	-	-	1
F2 M7 M I	-	-	-	-	-	-	1
F2 M2 M	+	+	+	+	+	+	3
F2 M2 T	-	-	-	-	-	-	1
F2 M7 T II	-	-	-	-	-	-	1
F2 M1 M	+	+	+	+	+	+	3
F2 M8 M	+	+	+	+	+	+	3
F1 M8 M	-	-	-	-	-	-	1
F2 M5 T	-	-	-	-	-	-	1
F1M4TII	-	-	-	-	-	-	1
F2M1T	-	-	-	-	-	-	1

Finca: (F), Muestra (M), Reacción negativa: (-), Reacción positiva: (+)

## 5.2 Caracterización de razas de *Ralstonia solanacearum*

En este estudio se utilizaron plantas de tabaco variedad habano criollo (*Nicotiana tabacum*), para caracterizar los 19 aislados identificados como *R. solanacearum*. Los aislados se sometieron a la prueba hipersensibilidad en planta no huésped, pasada las 48 horas después de la infiltración se observó clorosis en la zona infiltrada, ocho días después se observó marchitamiento de las plantas. Estas características indican que los aislados pertenecen a la raza 1, a diferencia de la raza 3 que se caracteriza únicamente por presentar clorosis a lo ocho días después de la infiltración (Figura 3, Cuadro 4).

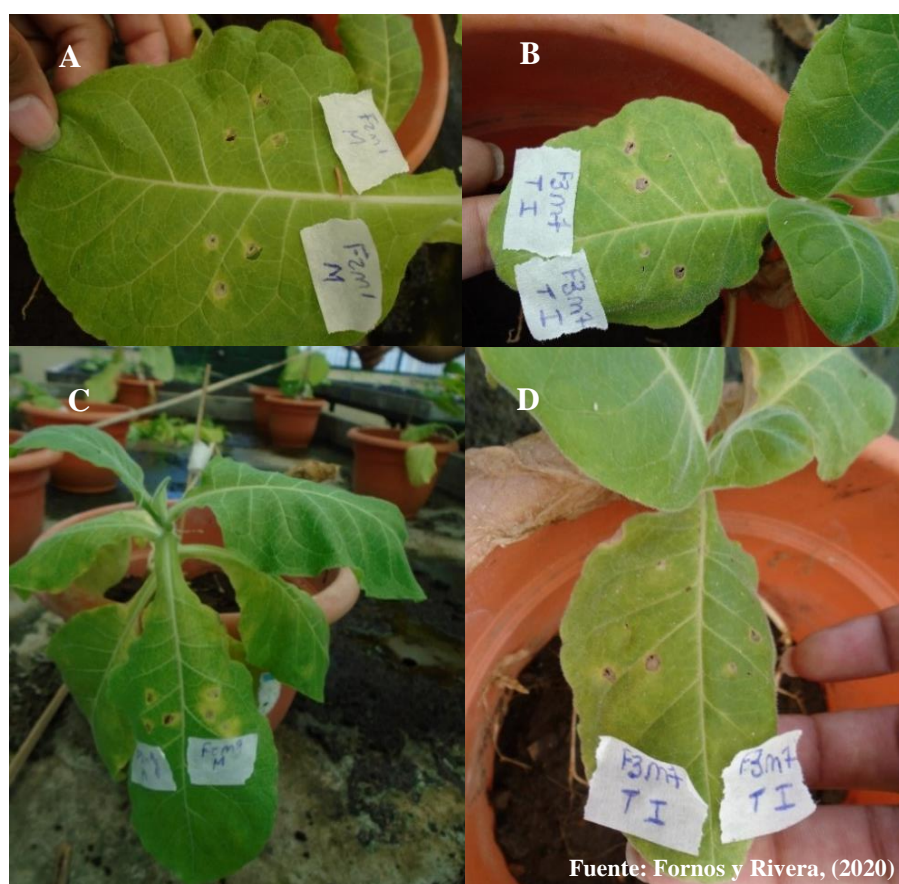


Figura 3. Caracterización de aislados de *Ralstonia solanacearum* procedentes de muestras de suelo y tejido vegetal del cultivo de papa. Clorosis a partir de 48 horas posteriores a la infiltración (A y B), y marchitamiento a partir de los siete y ocho días posteriores a la infiltración (C y D).

Cuadro 5. Caracterización de razas de *Ralstonia solanacearum*, según síntomas observados en plantas de tabaco en diferentes períodos después de la infiltración

Código de aislado	Horas después de la infiltración								Raza
	12	24	36	48	72	96	120	144	
F2 M7 T II	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M2 M	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M2 T	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M7 M III	-	-	-	C	C	C	C	C	1
M10	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M7 M I	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M10	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M6 T	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M9 M			-	C	C	C	C	C	1
F3 M7 T I	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M4 M	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F1 M8 M	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M8 M	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M1 M	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M5 T	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F1 M4 T II	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F1 M7 T II	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M7 M II	-	-	-	C	C	C	C	C	1
F2 M1 T	-	-	-	C	C	C	C	C	1

F: Finca, M: Muestra, C:Clorosis; A:amarillamiento intenso; RH: Reacción hipersensitiva, No reacción visible (-)

Según estudio de caracterización de razas y biovars de *Ralstonia solanacearum* realizado por Díaz (2005) en Nicaragua, se determinó que 20 aislados pertenecían a la raza 1 biovar 3 y siete pertenecían a la raza 2 biovar 3 prevaleciendo en los sitios muestreados el biovar 3.

Los resultados de este estudio tienen similitud con los resultados obtenidos por Ríos (2007), determinando mediante pruebas de fermentación- oxidación de carbohidratos e inoculación de plantas de tabaco la presencia de raza 1, biovar 1 y biovar 3 en el cultivo de papa en zonas de Estelí.

Estudio realizado por Rodríguez (2007), basado en la caracterización bioquímica de aislados de *R. solanacearum* en Solanáceas, determinó que el biovar 3, raza 1 es el agente causal de la marchitez bacteriana en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicom*) y chiltoma (*Capsicum*

*anuum*). Por otro lado, Gómez *et al.*, (2005), identificaron y caracterizaron 72 cepas de *R. solanacearum* (64 de tejido y ocho de suelo) aisladas a partir de tejido de plátano afectado, determinando mediante la prueba de fermentación-oxidación de carbohidratos y mediante inoculación en plantas de plátano en condiciones de invernadero, la presencia de la raza 2 biovar 1.

Obregón (2009), en un estudio de caracterización de la variabilidad poblacional de *Ralstonia solanacearum* en 36 aislados de la bacteria, de los cultivos Tomate (*Solanum lycopersicom*), Pimentones (*Capsicum annum*) y Berenjena (*Solanum melongena*), mediante las pruebas de fermentación- oxidación de carbohidratos e inoculación de plantas de tabaco, determinó que los aislados de berenjena correspondieron al biovar 2, en el caso de tomate pertenecieron al biovar 1 y en el pimentón predominó el biovar 2 y biovar 3.

Estudio realizado por Chavarro y Ángel (2006), en 200 muestras recolectadas del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) y plátano (*Musa paradisiaca*), mediante la técnica NCM-ELISA, determinaron 36 aislamientos de *R. solanacearum*. Las razas y biovars se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación obteniendo como resultado agrupaciones correspondientes a la raza 3, biovar 2, en aislados de papa (*Solanum tuberosum* L.) y agrupaciones de raza 2, biovar 1 en aislamiento de plátano (*Musa paradisiaca*).

### **5.3 Determinación fenotípica de mecanismo de resistencia**

Los resultados de antibiogramas realizados por el método de Kirby-Bauer en 19 muestras identificadas como *R. solanacearum*, mostraron que 12 aislados expresaron el fenotipo AmpC hiperproducido (derreprimido), de estos, ocho fueron aislados de fincas productoras de papa de la reserva natural Miraflor y cuatro de la reserva natural Tisey, mientras tanto, siete aislados fueron susceptibles a los antibióticos utilizados para determinar mecanismos de resistencia, indicando **que no hay presencia de mecanismo de resistencia, además fueron catalogados como aislados salvajes** (Figura 4, Anexo 6). Los aislados con fenotipo AmpC mostraron resistencia a Cefoxitina (FOX) no observándose halos de inhibición, mientras que los fenotipos salvajes mostraron halos de inhibición mayores a 18 mm. En relación con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) no se observaron halos de inhibición con achatamientos en la zona de sinergia



entre ampicilina + ácido clavulánico con los discos de Cefepime (FEP) y Ceftazidima (CAZ), por tanto, se descartó la presencia de BLEE.

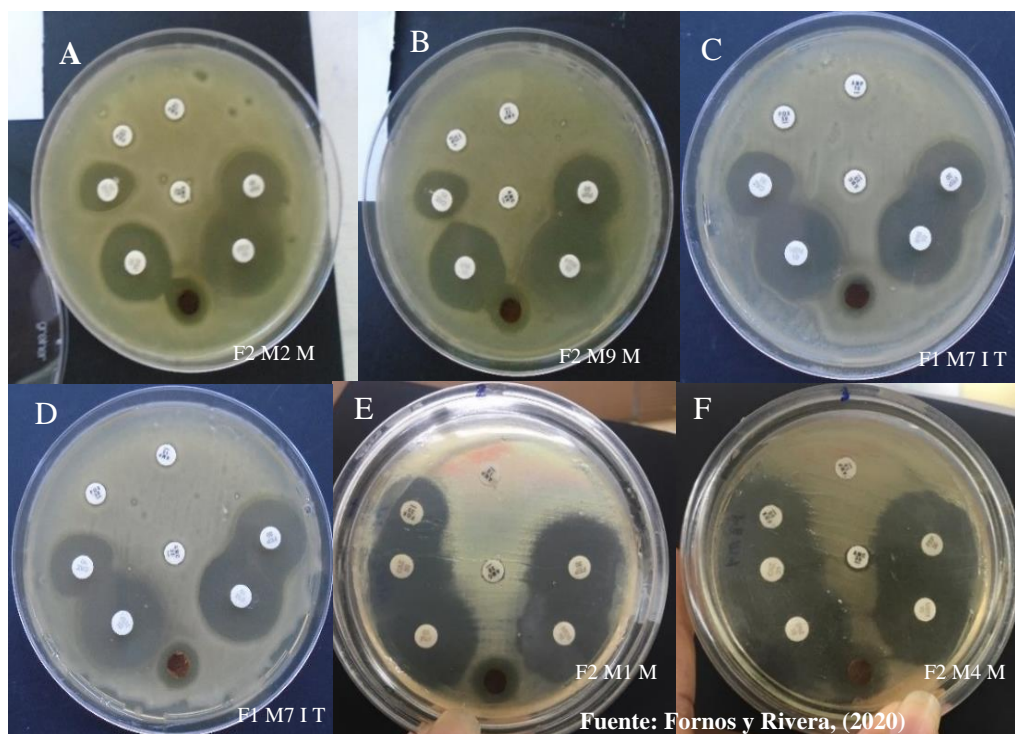


Figura 4. Aislados de *Ralstonia solanacearum* con fenotipos AmpC hiperproducido (A, B, C y D) y fenotipos salvajes (E y F) aislados de las zonas de muestreo.

En las muestras procedentes de la reserva natural Miraflor se identificaron ocho fenotipos AmpC hiperproducido y tres fenotipos salvajes, a diferencia de la reserva natural Tisey, en cuyas muestras se identificaron cuatro fenotipos con AmpC y cuatro fenotipos salvajes (Cuadro 6). Los resultados de esta investigación indican la presencia de un fenotipo salvaje y un fenotipo con el mecanismo de resistencia AmpC, además se presume que dicho mecanismo de resistencia identificado en los aislados de *R. solanacearum* es adquirido y posiblemente esté relacionado con una mutación en el DNA del plásmido debido a que no hay reporte del gen AmpC en la secuencia genómica del cromosoma ni en el plásmido de la bacteria. (Salanoubat et al., 2002; Schoch et al., 2020)

El estudio de mecanismos de resistencia en bacterias con antibióticos normalmente se utiliza en el área de medicina clínica, para determinar mecanismos de resistencias naturales y adquiridas que presentan especies de bacterianas que afectan a humanos, sin embargo, en el área agrícola



hay poca información de investigaciones de este tipo, particularmente en patógenos que afectan a los cultivos.

Cuadro 6. Mecanismos de resistencias identificados en aislados de *Ralstonia solanacearum* procedentes del cultivo de papa

Códigos de aislados	Localidad	Tejido vegetal	Suelo	AmpC Hiperproducido	BLEE	Fenotipo sensible
F2 M2 M	Miraflor		+	+	-	-
F2 M7 M III	Miraflor		+	+	-	-
M10	Miraflor	+		+	-	-
F2 M10	Miraflor		+	+	-	-
F2 M4 M	Miraflor	+		-	-	+
F1 M8 M	Miraflor		+	+	-	-
F2 M1 M	Miraflor	+		-	-	+
F2 M8 M	Miraflor	+		-	-	+
F2 M7 M II	Miraflor		+	+	-	-
F2 M9 M	Miraflor		+	+	-	-
F2 M7 T II	Tisey		+	-	-	+
F2 M2 T	Tisey		+	-	-	+
F2 M7 M I	Miraflor		+	+	-	-
F2 M6 T	Tisey		+	-	-	+
F3 M7 T I	Tisey		+	-	-	+
F2 M5 T	Tisey		+	-	-	+
F1 M4 T II	Tisey		+	-	-	+
F1 M7 T II	Tisey		+	-	-	+
F2 M1 T	Tisey		+	-	-	+

Finca: (F), Muestra: (M), Reacción negativa: (-), Reacción positiva: (+)

Crespo (2002), mediante la prueba de sensibilidad de antibióticos determino tres fenotipos AmpC, cuatro fenotipos BLEE y uno Beta-lactamasas clase A, en relación con *Escherichia coli* determinó dos AmpC hiperproducido y cuatro fenotipos BLEE. En este mismo estudio la prueba de sensibilidad a antibióticos en aislados con fenotipos salvajes de *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*, mostraron una mayor concentración de AmpC en diferentes niveles y poca concentración de fenotipos BLEE.

En el área de la agricultura existen pocos estudios relacionados a mecanismos de resistencia de bacterias fitopatógenas sin embargo, Ccorahua y Ramírez (2019) en un estudio clínico de

prevalencia de BLEE y AmpC de las especies de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en muestras de orina confirmó mediante el método de Sit Vitek que el 47% de las cepas de *E. coli* presentaban el fenotipo BLEE y 3.9% resultaron positivas para AmpC, en cambio las cepas de *Klebsiella pneumoniae* pertenecían al fenotipo BLEE y ninguna cepa presento fenotipo AmpC.

Schmidtke y Hanson (2006) mencionan que se han encontrado en plásmidos genes *ampC* de diferentes orígenes genéticos, incluidos *C. freundii* y *M. morganii*. El movimiento de estos genes en plásmidos aumentó la prevalencia de este mecanismo de resistencia mediante la diseminación del gen en organismos gramnegativos que naturalmente no portan genes que codifiquen AmpC, como *Salmonella* spp. y *Klebsiella pneumoniae*, además confirma que el gen AmpD es un mecanismo involucrado en la sobreproducción de AmpC que conduce a un fenotipo dereprimido y una enzima importante en la vía de reciclaje de la pared célula.

Tans-Kersten y Allen (2000), demuestra la presencia del gen AmpD en la bacteria *Ralstonia solanacearum*, que codifica para la enzima AmpD que consiste en una amidasa citoplasmática (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa), además propone la posibilidad que AmpD realice otras funciones desconocidas en la célula bacteriana, tales como factor de virulencia para el marchitamiento bacteriano o bien podría funcionar como autolisina durante patogénesis de la marchitez bacteriana.

## VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 19 aislados bacterianos que fueron identificados como *Ralstonia solanacearum*, de estos cuatro se obtuvieron de tejido vegetal y 15 de muestras de suelo, así mismo 14 aislados pertenecen al biovar 1 y cinco al biovar 3.

Los 19 aislados de *Ralstonia solanacearum* pertenecen a la raza 1 por presentar clorosis 48 horas después de la inoculación y marchitamiento a los siete y ocho días después de la inoculación.

A partir de las muestras estudiadas se identificó 12 aislados de *Ralstonia solanacearum* con mecanismo de resistencia AmpC hiperproducido y siete aislados catalogados como salvajes.

## VII. RECOMENDACIONES

Ampliar zonas de muestreo y cultivos huésped en busca de mecanismo de resistencia en aislados *Ralstonia solanacearum*.

Evaluar resistencia de *Ralstonia solanacearum* in vitro e in situ a antimicrobianos de uso agrícola.

Realizar estudios moleculares para confirmar la presencia del gen AmpC en aislados de *Ralstonia solanacearum*.

Evaluar virulencia y patogenicidad de los aislados con fenotipos AmpC hiperproducido y fenotipos salvajes de *Ralstonia solanacearum*.

## VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Bolaños, L. M. (2013). Ficha Técnica No. 3 *Moko del plátano Ralstonia solanacearum* raza 2 Smith. *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*, 2(3), 1–24. Recuperado de [sinavef.dgsv@senasica.gob.mx](mailto:sinavef.dgsv@senasica.gob.mx).
- Borba, N. (2008). *La papa un alimento básico*. Recuperado de <http://frutas-y-verdura.weebly.com/uploads/5/5/6/8/55681601/papa.pdf>
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández Cuenca, F., Mirelis, B., y Navarro, F. (2011). *Detección Fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica*, 29 (7), 4-54.
- Ccorathua, L y Ramírez, L (2019). *Prevalencia de Espectro Extendido y AmpC en Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae Aislados de muestras de orina de pacientes hospitalizados y ambulantes en el Hospital Regional de Ayacucho* febrero 2015-2016. (Tesis de Especialidad). Universidad Nacional De Trujillo, Perú.
- Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médica. ANMAT. (2015). Amoxicilina. Vademecum. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a051.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2014). Cefoxitina, Ceftazidima y Meropenem. VADEMECUM. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c045.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2012). Cefepima y Imepenem. VADEMECUM. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a019.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2004). Acido Clavulánico + Amoxicilina. VADEMECUM. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a019.htm>

- Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (2004). *Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica*. Litonic. Managua, Nicaragua 273-297p.
- Champoiseau PG, Jones JB and Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.
- Chavarro, M y Ángel, J. (2006). *Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de Ralstonia solanacearum y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD*, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8 (1), 14-31.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informacional Supplement*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader-.html?id=59202-0696b7e4d462166956&assetKey=AS%3A496054988533760%401495280134033>
- Crespo, M. (2002). *La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina*. *Colombia Médica*, Universidad del Valle Cali, Colombia, 33, (4),179-193.
- Díaz, U. (2005). *Caracterización preliminar de razas y biovares de Ralstonia solanacearum* (E.F. Smith) Yabuuchi et al., en Nicaragua. *La Calera*, 5(5). 24-31.
- Duarte-Raya, F. y Granados-Ramírez, M. (2012). *Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel*. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, (50), 3, 289- 300.
- Echevarría Zarate, J. (1998). *Resistencia bacteriana*. *Revista Médica Herediana*, 9(2), 53-55. Recuperado en 28 de marzo de 2021, de [http://www.scielo.org.-pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018130X1998000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.-pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X1998000200002&lng=es&tlng=es).
- Esquivel Solano, M. A. (2017). *Evolución de la susceptibilidad a la marchitez bacteriana (Ralstonia solanacearum) en genotipos promisorios y parientes silvestres de la papa en Costa Rica*. (Tesis de grado). Escuela de agronomía, Costa Rica.

- Fernández, C. (1985). *La Marchitez Bacteriana de la Papa*. 30, 17–19.  
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/30825/NR03799.pdf?sequence=1>
- French, E., Gutarra, L. y Aley (1995). *Medios de cultivo para el aislamiento e identificación de Pseudomonas solanacearum*. Centro Internacional de la Papa (CIP)
- García, D. (2001). *Uso del Ácido Etilendiamino Tetra acético (EDTA) en la terapia Endodóntica. El Odontólogo Invitado*. Recuperado de [https://www.carlosboveda.com/-Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado\\_11.htm](https://www.carlosboveda.com/-Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_11.htm).
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., y Villa, J. (2012). *Procedimientos en Microbiología. En Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1–54.  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia8a.pdf>.
- Gómez, E., Álvarez, E. y Llano, G. (2005). *Identificación y caracterización de cepas de Ralstonia solanacearum raza 2, Agente causal del moko de plátano, Fitopatología Colombiana*, 8 (2). 72-75.
- Harrigan, W y Cance, M. (1996). *Prueba o test de hipersensibilidad en planta no huésped. Bacteria Fito patógena*. Laboratory methods in microbiology. Recuperado de <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/bacterias.html>.
- Hazen, K. (2018). *Pruebas de Sensibilidad o antibiogramas*. Manual MSD. University Health System. Recuperado por <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria. (2019). *Lista de plagas no cuarentenadas en Nicaragua*. Recuperado de [https://assets.ippc.int/static/media/files/eventreporting/2019/02/27/lista\\_de\\_plagas\\_presentes\\_en\\_nicaragua\\_version\\_v\\_febrero\\_2019.pdf](https://assets.ippc.int/static/media/files/eventreporting/2019/02/27/lista_de_plagas_presentes_en_nicaragua_version_v_febrero_2019.pdf).

- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2020). *Recomendaciones para la producción de papa en la época de primera 2020* (pp. 1–2). Recuperado de <https://inta.gob.ni/wp-content/uploads/2020/04/Recomendaciones-produccion-Papa-DEPARTAMENTAL-ESTELI-2020.pdf>
- Kelman, A. (1954). *The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium médium*. *Phytopathology*, 44, 693-695.
- Leveratto, C. (2015). *El cultivo de Papa*. (I. Informa, Ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Recuperado el 13 de 02 de 2020, de <https://inta.gob.ar/noticias/el-cultivo-de-papa>
- Lim, T. (2016). *Solanum tuberosum*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, 12–93. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5_2).
- Lozano, J y Sequeira, L. 1970. *Differentiation of races of by a leaf infiltration technique*. *Phytopathology*, 60:833-838.
- Menocal, O. A. (2006). *La Papa en Nicaragua* 14–21. Recuperada de [http://guiagronicaragua.com/wp-content/uploads/2016/11/papa-nicaragua\\_opt.pdf](http://guiagronicaragua.com/wp-content/uploads/2016/11/papa-nicaragua_opt.pdf).
- Molina, J. D.; Mairena Santos, B.; Aguilar L. (2004). *Manejo Integrado de Plagas*. Recuperado de <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>
- Moreno, C., González, R., y Beltrán, C. (2009). *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69(2), 185–192.
- Naranjo, E., y Martínez, Y. (2013). *Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (Ralstonia solanacearum): situación actual y perspectivas en Cuba*. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), 160–170.
- Obregón, V. (2009). *Caracterización de la variabilidad poblacional de Ralstonia solanacearum en cultivos de solanáceas del Noreste Argentino*. (Tesis de Grado). Universidad Nacional del Litoral, Argentina.



- Perea, S., García, E., Allende, M., Carrillo, F., León, F., Valdez, T. y López, S. (2011). *Identificación de razas y biovars de aisladas de plantas de tomate. Ralstonia solanacearum* Revista Mexicana de Fitopatología, 29. 98-108.
- Pérez-Cano, H. J., y Robles-Contreras, A. (2013). *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana*. Revista Médica MD, 4(3), 186–191.
- Ríos, G. (2007). *Distribución y variabilidad de Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, agente causal de marchitez bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L), en tres departamentos del norte de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega). (Tesis de Grado), Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Recuperado de <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnh20r586.pdf>.
- Rodríguez D. (2007). *Determinación de biovars y razas de Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. (Tesis de Grado), Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Román, M., y Hurtado, G. (2002). *Cultivo de la Papa*. Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal, 34.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choise N, Claudel-Renard C, Cunnac S, Demange N, Gaspin C, Lavie M, Moisan A, Robert C, Saurin W, Schiex T, Siguier P, Thébault P, Whalen M, Wincker P, Levy M, Weissenbach J, Boucher CA. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature. 2002 Jan 31;415(6871):497-502. doi: 10.1038/415497a.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. y Chun, W. 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. USA: American Phytopathological Society (APS press). 3:373
- Schmidtke, A y Hanson, N. (2006). *Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC- mediated  $\beta$ -lactam resistance*. Antimicrob Agents Chemother. 50 (6), 2030-2037.

- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton C. L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., Richard Mcveigh, O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J. P., Sun Lu., Turner S y Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools). Database Oxford 2020; 2020: baaa062. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=267608&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Tans-Kersten, J. Gay, J. y Allen, C. (2000). *Ralstonia solanacearum* AmpD is required for wild-type bacterial wilt virulence. *Molecular Plant Pathology*. 1(3), 179–185.
- Torrez, P. N. (2009). *Potencial de mercado de la papa en Nicaragua. La Calera*, 36–43. <https://repositorio.una.edu.ni/2313/1/ppe70t694.pdf>
- Vespero, E. C.; Perugini, M. R. E. y Saridakis, H. O. (2007). *Screening and confirmatory assays for detection of ESBLs (extended spectrum  $\beta$ -lactamases) production by Klebsiella pneumoniae isolates. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*. 28(1), 33-38.

## IX. ANEXOS

Anexo 1. Colecta de muestras con síntomas de marchitamiento bacteriano en fincas productoras de papa



Anexo 2. Test de flujo bacteriano positivo en muestras de tallos del cultivo de papa



Anexo 3. Inoculación de aislados de *Ralstonia solanacearum* en espacios intervenales de hojas de tabaco

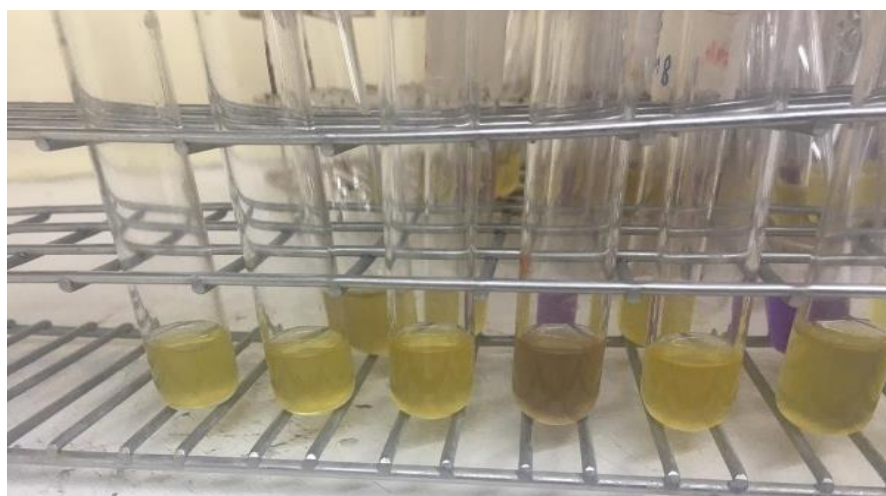


Anexo 4: Criterios interpretativos de halos de inhibición

Antibióticos	Siglas	Concentración µg	S	I	R
Ampicilina	AMP	10	≥ 17 mm	14-16 mm	≤ 13 mm
Cefepima	FEP	30	≥ 25 mm	20-22 mm	≤ 18 mm
Imepinem	IMP	10	≥ 23 mm	20-22 mm	≤ 19 mm
Cefoxitina	FOX	30	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm
Ceftazidima	CAZ	30	≥ 25 mm	18-20 mm	≤ 17 mm
Meropenem	MEM	10	≥ 23 mm	20-22 mm	≤ 19 mm
Amoxicilina más ácido clavulánico.	AMC	20/10	≥ 18 mm	14-17 mm	≤ 13 mm

Sensible: **S**, Intermedio: **I**, Resistente: **R**

Anexo 5. Pruebas bioquímicas positivas para *Ralstonia solanacearum* biovar 3



Anexo 6: Resultados de lecturas de halos de inhibición producidos en los antibiogramas

Código de aislados	Medidas de halos de inhibición (mm)							
	AMC	FOX	AMP	CAZ	IMP	MEP	FEP	EDTA
M10	6	6	6	22	56	41	30	6
F2M1T	8	24	6	30	30	32	36	16
F2M4M	6	22	6	26	30	30	30	12
F2M8M	8	24	6	26	30	38	32	12
F3M7 T I	6	6	6	19	26	25	22	6
F1M7 T II	6	6	6	30	30	38	30	6
F1M4 T II	60	40	30	30	30	38	30	6
F2M7 M III	6	6	6	24	30	30	24	6
F2M7 T II	6	6	6	22	24	30	26	6
F2M1 M	28	24	30	30	30	30	30	6
F2M2 T	6	6	6	22	29	28	26	6
F2M7 M II	6	6	6	18	25	30	23	20
F2M2 M	6	6	6	18	20	30	20	12
F2M7 M I	6	6	6	20	24	30	22	12
F2M5 T	28	14	26	8	48	36	12	20
F2M10 M	6	6	6	20	22	26	20	18
F1M8 M	6	6	6	20	25	30	30	20
F2M9 M	6	6	6	20	26	30	20	10
F2M7 M III	6	6	6	20	30	30	26	20

Finca: (F), Muestra: (M)